

V. Hetherly

Giessen 1972

Aus der Medizinischen Poliklinik
der Justus Liebig-Universität Giessen
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Dengler
und dem Mikrobiologischen Institut
der Justus Liebig-Universität Giessen
Direktor: Professor Dr. med. H. - J. Wellensieck

Bakteriologische Untersuchungen zur Umwandlung
von Na-Cyclamat in Cyclohexylamin.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des
Bereichs Humanmedizin
der
Justus Liebig-Universität
Giessen

vorgelegt von
Vroni Hetherly
aus Tschelbon/CSSR

Giessen

1 9 7 2

Dekan : Prof. Dr. HJ. Staudinger

Referent : Prof. Dr.med. H.J. Dengler

Correferent : Prof. Dr. med.H.-J.Wellensieck



1. Einleitung : Problemstellung
2. Methodik
 - 2.1 PROBANDEN
 - 2.11 Frau K.
 - 2.12 Herr M.
 - 2.2 MATERIAL und METHODE
 - 2.21 Nährböden und ihre Herstellung, verwendete Chemikalien
 - 2.22 Cyclohexylaminbestimmung
 - 2.3 Züchtung der Bakterien und Aufarbeitung
3. Ergebnisse
 - 3.1 Versuche mit bakterieller Mischflora
 - 3.11 Untersuchung der Stuhlflora des Konverters
 - 3.12 Vorversuche mit flüssigen Medien
 - 3.13 Versuche mit festen Nährmedien
 - 3.2 Anreicherungsböden und Übergang auf Reinkulturen
 - 3.21 Selektivböden
 - 3.211 Zusatz verschiedener Antibiotika
 - 3.212 Zusatz von Natriumazid
 - 3.213 Lactobacillusselektivagar
 - 3.22 Optimal Nährmedium mit besonderen Zusätzen
 - 3.3 Abhängigkeit der CHA-Spaltung vom pH-Wert
 - 3.4 Isolierung von Reinkulturen
 - 3.41 Methode
 - 3.42 Erneute Isolierung von Reinkulturen mit abgeänderter Methode
 - 3.5 Übergang auf flüssiges Nährmedium
 - 3.51 Untersuchung der CHA-Flüchtigkeit im flüssigen Medium
 - 3.52 Mischkulturen in mod. Rosenow-Bouillon
 - 3.6 Erneute Isolierung von Reinkulturen
 - 3.61 Vermeidung der Vorinkubation mit Cyclamat
 - 3.62 Versuche mit dem Konverter K.
4. Zusammenfassung
5. Diskussion
6. Verzeichnis der Tabellen
7. Literatur

1. EINLEITUNG: Problemstellung

Seit Kojima und Ichibagase 1966 erstmals nachwiesen, daß Cyclamate bei Hunden und Menschen metabolisiert werden, haben sich zahlreiche Untersuchungen diesem Problem gewidmet.

Cyclamate-meist wird das Na-Salz verwendet-zählen zu den künstlichen Süßstoffen. Ihre Süßkraft beträgt etwa das 35-fache des normalen Zuckers; ihr Hauptverwendungsgebiet neben der Diabetesdiät liegt in der Herstellung von diätetischen Getränken.

Als bekannt wurde, daß zahlreiche Tierspezies und eine große Anzahl von Menschen, sog. Konverter, einen Teil des aufgenommenen Cyclamates in Cyclohexylamin(CHA) umwandeln, wurden die Cyclamate auf der ganzen Welt zum Problem.

Aus der Gewerbetoxikologie, wo CHA zur Herstellung von Farbstoffen, Insektiziden etc. benötigt wird, sind eine chron.tox. Effekte schon seit langem bekannt.

Pharmakologisch zählt CHA zu den indirekt, d.h. über die Freisetzung von Noradrenalin, wirkenden Sympathomimetica. Diese Wirkung ist allerdings nur schwach ausgeprägt.

In jüngerer Zeit ließen Untersuchungen am Dickdarminhalt von Hund (Goldberg 1969), Ratte (Renwick und Williams 1971) und Schwein (Collings, 1970) darauf schließen, daß die Umwandlung von Cyclamat in CHA im Dickdarm stattfindet und daß dieser Vorgang durch bestimmte Bakterien ausgelöst wird.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher der Versuch gemacht werden, diese Hypothese zu beweisen und die Bakterien zu finden, die die Umwandlung von Cyclamat in CHA bewirken.

2. METHODIK

2.1. PROBANDEN

Im Rahmen einer Studie über die Konverterhäufigkeit bei Cyclamatgabe, die an der Med. Poliklinik in Gießen 1970 und 1971 an Patienten mit Diabetes und Adipositas durchgeführt wurde, waren unter anderen Frau K. und Herr M. als Cyclamatkonverter aufgefallen.

2.11 Frau K.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Patientin 62 Jahre alt. Die stat. Aufnahme erfolgte wegen einer rechtsseitigen Pyelonephritis. Außerdem wurde ein bestehender Diabetes mellitus erstmals diagnostiziert. Die Vorgeschichte war im wesentlichen unauffällig.: 5 Schwangerschaften, Cholecystektomie bei Verschluß-ikterus.

Die Behandlung während des Klinikaufenthaltes bestand in: anfänglich Insulingaben, dann Einstellung mit Rastinon und 150 KH. Die antibiotische Behandlung erfolgte mit Tetracyclinen, nach Vorliegen des Antibiogramms mit Binotal, nach Entlassung aus der Klinik mit Nogram für weitere 3 Wochen. Anschließend wurde keine antibiotische Behandlung mehr durchgeführt.

Bei dem während des Klinikaufenthaltes durchgeführten " Standardtest ", bei welchem eine einmalige Menge von 1g Na-Cyclamat verabreicht wurde, spaltete Frau K. 6,5% des zugeführten Cyclamates.

2.12 Herr M.

Herr M. wurde wegen Angina Pectoris, fortschreitender Obergeschoßtuberkulose und asymptomatischem Diabetes mell. stationär behandelt. Er war im 68sten Lebensjahr.

Aus seiner Vorgeschichte erwähnenswert sind: Malaria (1941-43), Silikose seit 1965, Hepatitis 1970.

Er wurde behandelt mit Lanicor, Viscen, 0,6 g INH, 1,2 g Myambutol, 450 mg Rifampicin und 150 KH-Diät. Im Standardtest konvertierte er 0,5 % des zugeführten Cyclamates zu CHA.

Leider verstarb er einige Monate nach Beginn der hier vorliegenden Arbeit, so daß uns ab August 1971 nur noch Stuhl von Frau K. für unsere Untersuchungen zur Verfügung stand.

2.2 MATERIAL und METHODE

2.21 Nährböden und ihre Herstellung, verwendete Chemikalien. Da uns die zur Cyclamatspaltung befähigten Keime und ihre optimalen Wachstumsbedingungen unbekannt waren, galt es zunächst, ein möglichst neutrales, d.h. nicht selektives, Medium zu finden, auf dem sowohl aerobe als auch anaerobe Keime gut anzüchtbar waren.

Werner, H. (1965) empfiehlt in Anlehnung an Beerens für anaerobe Keime ein Hefeextrakt-Cystein-Basis-medium mit 10%igem Hammelblutzusatz:

Pepton tryptisch	10,0 g
NaCl	5,0 g
Fleischextrakt	2,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Cysteinchlorhydrat	0,3 g
Glucose	2,0 g
Bacto-Agar	20,0 g
Aqua dest ad 1000 ml	

Diese Mischung aufkochen, filtrieren, 20 Min. bei 115°C autoklavieren und vor Gebrauch 10% Hammelblut hinzufügen.

Wir verwendeten dieses Medium in geringer Abwandlung mit 7% Hammelblutzusatz und - da wir die Cyclamatspaltungsfähigkeit prüfen wollten- mit 1% Na-Cyclamat-zusatz an Stelle von Glucose. (Das Na-Cyclamat enthielt nach Auskunft der Herstellerfirma 5 ppm CHA). Außerdem benutzten wir als weitere Abwandlung dieses Nährbodens eine modifizierte Rosenow-Bouillon (Werner, H./Beerens 1965), da die Aufarbeitung des flüssigen Mediums weniger Zeit beanspruchte.

HEFEEXTRAKT- CYSTEIN-BASIS-Medium

Casein	7,5 g	(Fa. Merck)	= Pepton
Sojamehl	2,5 g	(Fa. Merck)	
NaCl	5,0 g	(Fa. Merck)	
Fleischextrakt	2,0 g	(Fa. Merck)	
HEFeextrakt	5,0 g	(Fa. Merck)	
Cysteinchlorhydrat	0,3 g	(Fa. Merck)	
Cyclamat	1 %	(Fa. Bayer)	
Agar(Nutrient Agar)	20,0 g	(Fa. DIFCO)	
+ 7 % Hammelblut			

MODIFIZIERTES ROSENOW-Medium

Casein	7,5 g	
Sojamehl	2,5 g	
NaCl	5,0 g	
Fleischextrakt	2,0 g	
Hefeextrakt	5,0 g	
Cysteinchlorhydrat	0,3 g	
Agar	0,5 g	
Cyclamat	1 %	
Harnstoff p.a.	0,5 %	(Fa. Merck)
Indikator nach Andrade	10 ml	(Fa. Merck)
Aqua dest. ad 1000 ml.		

Der Indikator nach Andrade wird zuletzt zugegeben:

Saures Fuchsin	0,5 g	} Ind.nach Andrade
1 N NaOH	16,0 ml	
H ₂ O	100,0 ml	
Saures Fuchsin in H ₂ O lösen und NaOH zugeben.		

Außer diesen beiden Basisnährmedien verwendeten wir noch Selektivmedien, deren Herstellung bei den jeweiligen Versuchen erwähnt wird.

Zur Züchtung anaerober Keime standen drei Verfahren zur Wahl:

1. Physikalische Verfahren(Entfernung des Luftsauerstoffes durch Evakuieren), z.B. Zeißler Topf, Anaerobic Jars.
2. Chemische Verfahren, z.B. Zusatz reduzierender Substanzen: Thioglycolat, bzw. Pyrogallol-Pottasche-Verfahren(sauerstoffbindende Pyrogallolwirkung in alk.Milieu).
3. Biologische Verfahren, z.B. Fortnerplatte(gemeinsame Bebrütung von O₂- verbrauchenden sowie CO₂- und H₂-bildenden

Bakterien im geschlossenen System).

Wir entschieden uns aus folgenden Gründen für das Pyrogallol-Pottasche-Verfahren:

1. unbegrenzte Kapazität auch bei großen Versuchsreihen-Vorteil gegenüber physikalischen Verfahren
2. wegen der relativ kurzen Zeit(ungefähr 1 Stunde), in der beim Pyrogallolverfahren eine Anaerobiose erreicht wird- Vorteil gegenüber Fortner-Verfahren.

A.Trevor Willis(1964) empfiehlt für das Pyrogallol-verfahren ein in den Deckel der Petrischale eingeklebt-tes Papierpäckchen, in das 2,0 g Pyrogallolmischung eingefüllt werden.

Die Pyrogallolmischung setzt sich wie folgt zusammen:

Pyrogallol	3,0 g
Na_2CO_3	3,0 g
Kieselgur	15,0 g

Jedem Päckchen werden 2,0 g dieser Mischung, die erst kurz vor Gebrauch angesetzt werden darf, zugegeben.

Die Petrischale wird mit erhitztem Paraffin verschlossen.

2.22 Cyclohexylaminbestimmung

Die CHA-Bestimmung wurde nach der von M.Eichelbaum und J.Hengstmann (1970) angegebenen Methode durchgeführt.

Als inneren Standard verwendeten wir n-Heptylamin.

2.221 Substanzen und Lösungsmittel

Benzol p.a. Merck
Dichlormethan p.a. Merck
Aceton p.a. Merck
1 N Essigsäure p.a. Merck
5 N NaOH= 5Teile NaOH 32%ig+3 Teile H_2O
Standard= Heptylamin 1 mg/ml in 0,1 N HCl, 1:10
in 0,1 N HCl verdünnt.

Cyclohexylamin puriss. Fluka

2.222 Gerät

Gaschromatograph Modell 5700 der Fa.Hewlett Packard.

Säule: 28% Pennwalt 223 + 5 % KOH auf Gas-Chrom Q (AW+DMCS)
80-100 mesh, 6'x1/8"

Betriebsbedingung: Inlet: 200°C
Detector: 220°C
Säule: 155°C

Trägergas: N₂: 35 ml/min
H₂: 25 ml/min
O₂: 180 ml/min

2.3 Züchtung und Aufarbeitung.

Frischer Stuhl eines Konverters wird durch Schütteln mit Glasperlen homogenisiert und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 1;100, bzw. eine andere Verdünnung, verdünnt. Je 0,1 ml der Suspension werden mit Glasspateln auf eine Agarplatte ausgespatelt und aerob sowie anaerob bebrütet.

Da die Kolonien in den höheren Stuhlverdünnungen weit voneinander entfernt in nur geringer Anzahl stehen, werden nach dreitägiger Bebrütung mit einem Glasspatel Verreibungen der alten Platten und je eine Verreibung auf eine neue Platte angelegt, um so eine Anreicherung zu erzielen. Nach mindestens fünftägiger Bebrütung bei 37°C wird der gesamte Agar durch Zerquetschen in einer Spritze zerkleinert, in 20 ml 0,1 N NaOH gebracht, über Nacht stehen gelassen und abschliessend zentrifugiert.

Nach der Gewichtsbestimmung und Prüfung des pH (evtl. Zugabe von 0,5 ml 5 N NaOH) folgt das Extraktionsverfahren nach Eichelbaum, M. und Hengstmann, J. (1970).

Dem alkalisierten Agar werden 0,25 ml Standard (n-Heptylamin) und 20 ml Benzol zugegeben.

Bei verschlossenem Gefäss wird anschliessend 10 min lang mit einem Magnetrührer gerührt, 2 min (2000 U) zentrifugiert; dann werden 18 ml der Benzolphase in eine Schüttelflasche,

in welche vorher bereits 2 ml 1 N Essigsäure eingebracht worden waren, einpipettiert; die Flasche wird verschlossen, 2min gerührt, abzentrifugiert.

In ein Schliffgläschen, das 0,5 ml 5 N NaOH und 0,2ml Dichlormethan enthält, werden 1,8 ml der unteren Phase des Schüttelglases einpipettiert, erneut 2 min gerührt und zentrifugiert.

Anschließend wird die gaschromatographische Messung durchgeführt, indem 0,5 ml der unteren Phase (Dichlormethan) auf die Säule aufgebracht werden.

Zur quantitativen Auswertung wird die Peakhöhe des Cyclohexylamins mit der des Standards verglichen. Aus der ermittelten Peakratio R läßt sich die entsprechende Gewichts-ratio ableiten, da das Gewicht des inneren Standards bekannt ist.

Die in den nachfolgenden Tabellen angegebenen Konzentrationen von CHA beziehen sich auf den Gehalt an CHA im ml des zerkleinerten und in NaOH aufgeschwemmten Agars.

3. ERGEBNISSE

3.1. Versuche mit bakterieller Mischflora

3.11 Untersuchung der Stuhlflora des Konverters

Nachdem sich in einer klinischen Studie gezeigt hatte, daß einige Patienten Cyclamat zu CHA abbauen können, während andere Patienten diese Fähigkeit nicht besitzen, lag zunächst die Frage nahe, ob Konverter eine andere Stuhlflora besitzen als Nichtkonverter.

Deshalb stellten wir Stuhlsuspensionen 10^{-2} bis 10^{-9} her (1 g Stuhl in 100 ml phys. NaCl homogenisieren = Susp. 10^{-2} , dann jeweils 1:10 verdünnen, bis 10^{-9}), spatelten je 0,1 ml dieser Stuhlverdünnungen mit einem Glasspatel auf je 1 Blut-, Endo- und SS-Platte und bebrüteten diese Platten einen Tag(aerob). Dann wurden mit einer Platinnadel Einzelkolonien abgeimpft. Die Differenzierung dieser Reinkulturen erfolgte mittels Präparat und " Bunter Reihe", welche bei uns aus

Kligler-Agar
Trypsinbouillon (Indolnachweis)
Harnstoffbouillon
Dextrosebouillon
Saccharosebouillon
Lactosebouillon
Maltosebouillon
Mannitbouillon
Citratagar

bestand.

Es ergaben sich hierbei keine pathologischen Befunde. Die aerob untersuchte Flora des Konverters konnte als normal angesehen werden.

3.12 Vorversuche mit flüssigen Medien.

3.121 Herstellung einer 1%igen Cyclamatlösung

NaCl	5,0g
Cysteinchlorhydrat	0,3g
Cyclamat	1%
H ₂ O ad 1000 ml	
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

Wir bebrüteten je 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension eines nachgewiesenen Konverters in 10 ml der oben angegebenen Cyclamatlösung (3 Tage, bei 37°C , aerob), konnten aber kein CHA nachweisen und gingen deshalb auf ein angereichertes flüssiges Nährmedium über.

3.122 Flüssiges Grundmedium

Caseinpepton	7,5 g
Sojamehl	2,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
NaCl	5,0 g
Cyclamat	1%
Aqua dest ad	1000 ml

Je 10 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension der beiden Konverter wurden in 250 ml flüssigem Grundmedium 3 Tage bei 37°C bebrütet, und zwar aerob sowie anaerob (Durchströmung mit N_2). Auch in diesem Versuch war CHA nicht nachweisbar. Dieses negative Versuchsergebnis legte die Annahme nahe, daß die gesuchten Keime nur einen kleinen Anteil der Stuhlflora ausmachen, daß ihr Wachstum von weiteren Zusätzen zum Medium abhängig ist, bzw. durch die Anwesenheit anderer Keime gehemmt wird.

3.13 Versuche mit festen Nährmedien.

In Anlehnung an Werner, H. und Beerens wählten wir ein Hefeextrakt-Cystein-Basismedium mit Hammelblutzusatz plus 1% Cyclamat, im folgenden Optimalnährboden genannt. In den Versuchsreihen 1a+1b, sowie 2a+2b sollte geklärt werden, inwieweit die Cyclamatspaltung abhängt von:

- I. der Keimzahl (Stuhlverdünnung)
- II. der Bebrütungsdauer
- III. aeroben, bzw. anaeroben Bebrütungsbedingungen .

Um einen Hinweis über die Anzahl der zur Cyclamatspaltung befähigten Keime im Stuhl zu erhalten, fertigten wir Stuhlverdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-9} an; die Auszählung der Keime im unverdünnten Stuhl ergab $10^{11}/\text{ml}$, d.h. bei einer Verdünnung von 10^{-9} liegen noch 10^2 Keime/ml vor.

Versuch 1a+b:

0,1 ml einer Stuhlsuspension (10^{-2} bis 10^{-9}) werden auf den oben beschriebenen Optimalnährboden ausgeimpft und unter aeroben Bedingungen bebrütet (37°C)

1 a: Bebrütung 4 Tage aerob

1 b: Bebrütung 11 Tage aerob

Weder nach 4 noch nach 11 Tagen aerober Bebrütung ließ sich in einer der Stuhlverdünnungen CHA nachweisen.

Versuch 2a+b:

0,1 ml einer Stuhlsuspension (10^{-2} bis 10^{-9}) werden auf den Optimal-NB ausgeimpft und unter anaeroben Bedingungen (Pyrogallolverfahren) bei 37°C bebrütet.

2 a: Bebrütung 4 Tage anaerob

2 b: Bebrütung 11 Tage anaerob

Tabelle 1: CHA-Bildung bei Stuhlverdünnung 10^{-2} bis 10^{-9} (4 Tage anaerob)

Verdünnung	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
10^{-2}	30,58
10^{-3}	11,07
10^{-4}	1,33
10^{-5}	0
10^{-6}	0
10^{-7}	0
10^{-8}	0
10^{-9}	0

Tabelle 2: CHA-Bildung bei Stuhlverdünnung 10^{-2} bis 10^{-9} (11 Tage anaerob)

Verdünnung	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
10^{-2}	6,93
10^{-3}	2,01
10^{-4}	2,22
10^{-5}	0
10^{-6}	0
10^{-7}	0
10^{-8}	0
10^{-9}	0

Aus diesen beiden Versuchen ging hervor, daß eine Cyclamatspaltung nur in den Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-3} und 10^{-4} nachweisbar war, wenn die Bebrütung unter anaeroben Bedingungen erfolgte. Ab Verdünnungsgrad 10^{-5} und höher erfolgte keine Cyclamatspaltung mehr, was sich nur durch die Annahme erklären läßt, daß die zur Cyclamatspaltung fähigen Keime bloß einen relativ kleinen Anteil der Gesamtkeime im Stuhl ausmachen. Denn die Auszählung einer 10^{-9} Suspension ergibt noch 100 Keime pro ml.

Zur Frage, welchen Einfluß die Bebrütungsdauer auf die Cyclamatspaltung ausübt, gaben die beiden ersten Versuche keine eindeutige Auskunft. Deshalb wurde im folgenden Experiment die CHA-Entstehung in Abhängigkeit zur Bebrütungsdauer untersucht.

Da sich in den vorausgegangenen Versuchen nur anaerobe Bebrütungsverhältnisse und relativ geringe Stuhlverdünnung als günstig erwiesen hatte, wurde der Optimal-NB mit 0,1 ml einer 10^{-2} Suspension beimpft und die CHA-Bestimmung nach 1,2,3,4 und 5-tägiger anaerober Bebrütung durchgeführt (Versuch 3)

Tabelle 3: Abhängigkeit der CHA-Entstehung von der Bebrütungsdauer.

Bebrütungsdauer (Tage)	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	10

In einem weiteren Zeitversuch wurde die CHA-Bestimmung nach 5,10,15 und 20 Tagen durchgeführt.

Versuch 4:

Je 0,1 ml einer 10^2 Stuhlsuspension von Frau K., Herrn M. und einem Nichtkonverter werden auf den Optimal-NB ausgeimpft und unter anaeroben, zur Kontrolle auch unter aeroben, Bedingungen 5,10, 15 bzw. 20 Tage bebrütet.

Tabelle 4: Zeitl. Abhängigkeit der CHA-Entstehung von der Bebrütungsdauer, zum Vergl. bei zwei Konvertern und einem Nichtkonverter.

	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 5 Tage B. anaerob	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 10 Tage B. anaerob	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 15 Tage B. anaerob	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 20 Tage B. anaerob
Fr.K.	13,10	5,24	2,04	0
H. M.	0,63	0	4,58	0
NK	0	0	0	0

Bei der parallel dazu durchgeführten Reihe unter aeroben Bedingungen war eine CHA-Bildung nicht nachweisbar. Mit Stuhl des Nichtkonverters erfolgte weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen eine Cyclamat-spaltung. Wie die Versuche 3 und 4 beweisen, ließ sich unter unseren Versuchsbedingungen eine CHA-Bildung um den 5. Bebrütungstag konstant, wenn auch in wechselnder Menge, nachweisen.

Eine Aussage darüber, wieviele Kolonien Cyclamat-spaltender Keime nötig sind, um $1 \mu\text{g}$ CHA zu bilden, ließ sich aber nicht machen. Es war jedoch anzunehmen, daß die Cyclamat-spaltungsfähigkeit verbessert würde, wenn durch Neuverreibung die vermutlich kleine Zahl der primär gewachsenen spaltungsfähigen Kolonien in einen dichten Rasen Cyclamat-spaltender Kolonien umgewandelt wurde.

Deshalb wurden im 5. Versuch die Versuchsbedingungen folgendermaßen verändert:

Versuch 5:

Je $0,1 \text{ ml}$ einer 10^{-2} Stuhlsuspension werden auf das Optimalmedium ausgeimpft und 3 Tage lang anaerob bebrütet. Dann werden die Platten geöffnet, 1 Tropfen sterile NaCl wird in die Mitte der Platten eingebracht, die einzeln stehenden Kolonien werden mit einem sterilen Glasspatel verrieben, anschließend wird mit dem gleichen Spatel auf einer neuen Platte eine Verreibung vorgenommen.

Beide Platten werden wieder mit einem Pyrogallol-päckchen versehen, paraffinversiegelt und weiter bebrütet.

Tabelle 5: CHA-Bildung nach Neuverreibung.

3 Tage Bebrütung, dann Neuverreibung und Bebrütung für weitere 1 bis 5 Tage.

Bebrütung nach Neuverreibung	CHA $\mu\text{g/ml}$
1 Tag	0
2 Tage	0,84
3 Tage	1,60
4 Tage	2,63
5 Tage	5,06

Dieser Versuch zeigte, daß bei durchgeführter Neuverreibung die CHA-Bildung mit der Bebrütungsdauer zunimmt. Im 6. Versuch sollte dieses Ergebnis kontrolliert werden.

Versuch 6a:

Bebrütung 5 Tage, Neuverreibung und Bebrütung für weitere 16 Tage

Versuch 6b:

Bebrütung 6 Tage, Neuverreibung, Bebrütung für 7 Tage, Neuverreibung, Bebrütung für weitere 22 Tage.

Tabelle 6a: CHA-Bildung nach Neuverreibung.

	Bebrütung 5 Tage CHA ($\mu\text{g/ml}$)	Bebrütung 5+16 Tage CHA ($\mu\text{g/ml}$)
Fr. K. Nr. 25	13,1	140,6
H. M. Nr. 26	0,63	71,58
Fr. K. Nr. 29	0	13,26
H. M. Nr. 30	0,98	150,88

Tabelle 6b: CHA-Bildung nach Neuverreibung

	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
Bebrütung 6 Tage	0
Bebrütung 6+7 Tage	10,0
Bebrütung 6+7+22 Tage	421,46

Aus diesen ersten Versuchen ergab sich zusammenfassend:
1. in der Stuhlflora von 2 Konvertern sind Bakterien vorhanden, die Cyclamat spalten und somit CHA bilden können.

2. die Bakterienflora eines Nichtkonverters ist unter unseren Versuchsbedingungen zur CHA-Bildung nicht fähig.

3. die Bakterien vollziehen die Cyclamatspaltung nur bei anaeroben Wachstumsbedingungen und ausreichender Bebrütungszeit.

4. nach Anreicherung der Bakterien durch Neuverreibung nimmt die Spaltungsfähigkeit deutlich zu und steigt mit der Bebrütungsdauer weiter an.

Unsere nächste Aufgabe sahen wir darin, die zur Cyclamatspaltung befähigten Keime in Reinkultur anzuzüchten. Da wir vermuteten, daß die gesuchten Bakterien nur einen kleinen Anteil der Gesamtflora unserer Stuhlsuspensionen ausmachten, versuchten wir zunächst, durch Anreicherungsböden eine gewisse Selektion zu betreiben, die Richtung der Selektion war völlig ungewiß.

3.2 Anreicherungsböden und Übergang auf Reinkulturen

3.21 Selektivböden

3.211 Zusatz verschiedener Antibiotika zum oben beschriebenen Optimal-NB(Hefeextrakt-Cystein-Basismedium mit Hammelblut und 1% Cyclamatzusatz).

3.2111 Zusatz von Oxacillin (Staphenor)

0,5 g Staphenor werden in 5 ml aqua dest. gelöst(entspricht 100 mg/ml). Diese Stammlösung wird mit NaCl auf 1:100 verdünnt (entspricht 1 mg/ml). Auf je 250 ml Optimal-NB werden 2,5 ml der 1:100 verdünnten Lösung aufgebracht.

Der Nährboden enthält dann 10 µg/ml .

3.2112 Zusatz von Streptomycin

Inhalt einer Injektionsflasche in 10 ml NaCl lösen (= 100 mg/ml).

Diese Stammlösung 1:100 mit NaCl verdünnen, davon 2,5 ml auf 250 ml Optimal-NB. Der Nährboden enthält dann 10 µg/ml.

3.2113 Zusatz von Polymyxin B

50 mg in 5 ml aqua dest. lösen(= 10 mg/ml), von dieser Lösung 0,5 ml auf 250 ml Optimal NB geben.

Der Nährboden enthält dann 20 µg/ml.

3.2114 Zusatz von Neomycin (Bycomycin 100)

500 mg Bycomycin in 5 ml aqua dest. lösen (=100 mg/ml)

Diese Lösung 1:10 verdünnen, davon 2,5 ml auf 250 ml Optimal-NB geben.

Der Nährboden enthält dann 100 µg/ml.

3.2115 Zusatz von Bycomycin 200

5 ml der 1:10 verdünnten Lösung von Nr. 3.2114 werden auf 250 ml Optimal-NB gebracht.

Der Boden enthält dann 200 µg/ml.

3.2116 Zusatz von Penicillin G

Penicillin-G-Na: 200 000 I.E.=120 mg/Flasche

1 Flasche in 5 ml aqua dest. lösen(= 24 mg/ml). Diese Stammlösung mit NaCl 1:100 verdünnen (=0,24 mg/ml oder 240 µg/ml). a. auf 250 ml Optimal NB werden 0,1 ml der 1:100 verdünnten Stammlösung gebracht. Nährboden enthält dann 0,1 µg/ml.

b. auf 250 ml Optimal-NB werden 1,05 ml der 1: 100 verdünnten Stammlösung gebracht. Nährboden enthält dann 1 µg/ml.

c. auf 250 ml Optimal NB werden 10,5 ml der 1: 100 verdünnten Stammlösung gebracht. Nährboden enthält dann 10 µg/ml.

Versuch 7:

Sämtliche mit Antibiotikazusatz versehenen Nährböden werden mit 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension beimpft und 4 Tage anaerob bebrütet. Am 4. Bebrütungstag werden die Platten geöffnet und Subkulturen angelegt:

- Subkulturen in 1. demselben Selektivmedium
2. antibiotikafreiem Optimalmedium

angelegt und weitere 6 Tage bebrütet.

Von den Subkulturen auf Selektivmedium wird außerdem je eine Kolonie isoliert, in einem Tropfen sterilem NaCl auf unseren Optimal-NB ausgespatelt und 7 Tage bebrütet.

Ergebnis des 7. Versuches:

In keiner der Reinkulturen, die aus den Subkulturen auf Selektivmedium gewonnen waren, ließ sich CHA nachweisen. In den Mischkulturen wurde CHA gebildet auf:

Stapenor (10 µg/ml) Selektivboden

Streptomycin (10 µg/ml) Selektivboden.

Alle übrigen Antibiotika-haltigen Selektivnährböden wiesen auch bei den Mischkulturen keine CHA-Bildung auf.

Tabelle 7: CHA-Bildung bei Mischkulturen auf Stapenor und Streptomycin-haltigen-NB

Bebrütung	CHA (µg/ml)
4 Tage Stapenor+ 6 Tage Stapenor	5,24
4 Tage Stapenor+ 6 Tage Optimal NB	19,54
4 Tage Streptom+ 6 Tage Streptom	0,3
4 Tage Streptom+ 6 Tage Optimal NB	0

3.212 Zusatz von Natrium-Azid

Natrium-Azidhaltige Nährböden gelten als Selektivmedien zur Anzüchtung grampositiver Bakterien, insbesondere zur Anzüchtung von Streptokokken und Clostridien aus Mischkulturen. Denn Natrium-Azid übt auf die meisten gramnegativen Keime eine bakterio-statische Wirkung aus, während das Wachstum der grampositiven Bakterien nicht nachteilig beeinflusst wird (Oxoid-Handbuch, A, Trevor Willis, 1964).

In Versuch 8 wurde deshalb Optimal-NB mit 200 µg/ml Natrium-Azid versetzt.

1,25 g NaN₃ in 50 ml NaCl lösen (= 25 mg/ml), 2 ml dieser Lösung auf 250 ml Optimal-NB geben.

Der Nährboden enthält dann 200 $\mu\text{g/ml}$

Versuch 8:

Je 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension werden auf NaN_3 -haltiges Nährmedium gebracht, 4 Tage bebrütet. Dann erfolgt Neuverreibung im gleichen Medium und Anlage einer Verreibung auf einer NaN_3 -freien Optimal-NB-Platte. Außerdem wird eine Reinkultur angelegt.

Ergebnis: Keine CHA-Bildung in der Reinkultur.
Keine CHA-Bildung bei den Mischkulturen, die nur auf NaN_3 -haltigen Böden gewachsen sind.
4,48 $\mu\text{g/ml}$ CHA bei den Mischkulturen, die 4 Tage auf NaN_3 und dann 6 Tage auf Optimal-NB ohne NaN_3 Zusatz gewachsen sind.

3.213 Lactobacillusselektivagar (Fa. Merck)

Der Lactobacillus-Agar ist ein für Lactobacillen hochselektives Medium und unterdrückt weitgehend das Wachstum von Schimmelpilzen, Streptokokken und anderen Mikroorganismen.

Versuch 9:

Lactobacillus-Selektivagar wird mit je 0,1 ml einer 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} Stuhlsuspension beimpft und 6 Tage bebrütet. Dann werden auf Lactobacillus-Agar, dem 1% Cyclamat beigefügt ist, Subkulturen angelegt und diese weitere 5 Tage bebrütet.

Ergebnis: Sämtliche angezüchteten Kolonien zeigten keine Cyclamatspaltung.

3.22 Optimalnährboden mit besonderen Zusätzen

3.221 Zusatz von 0,1 % NaNO_3

3.222 Zusatz von 0,1 % NaNO_2

3.223 Zusatz von 0,1 % Glucose

3.224 Zusatz von 1 % Lactose

3.225 Zusatz von 1% Saccharose

Versuch 10:

Je 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension werden auf Platten, denen NaNO_2 , NaNO_3 , Glucose, Lactose, bzw. Saccharose beigelegt ist, ausgeimpft, 3 Tage bebrütet, verrieben und weitere 5 Tage bebrütet. Zur Kontrolle wird eine Platte mitgeführt, die nur Optimal-NB enthält.

Tabelle 8: CHA-Bildung bei besonderen Zusätzen zum Optimal-NB

Zusätze	Bebrütung 3+5 Tage	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
0,1% NaNO_2		0
0,1% NaNO_3		0
1% Glucose		0,78
1% Lactose		0,16
1% Saccharose		0
Optimal NB ohne Zusatz		1,48

3.226 Zusatz von Salzen

Im 11. Versuch wurde unserem Cyclamathaltigen Optimalboden eine Reihe von Salzen zugefügt, u.z.

- auf je 1 l Optimal-NB werden 2,3 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ und 1,3 g KH_2PO_4
- auf je 1 l Optimal-NB werden 10 ml der folgenden Lösung:
 CaCl_2 0,2%
 MnCl_2 0,01%
 CoCl_2 0,01%
 ZnCl_2 0,01%,
- auf je 1 l Optimal-NB werden 10 ml der folgenden Lösung:
 MgSO_4 2,0%
 FeSO_4 0,5%

gegeben.

Versuch 11:

Je 0,1 ml einer frischen Stuhlsuspension in den Verdünnungsgraden 10^{-2} bis 10^{-9} werden auf eine Platte mit Optimal-NB und je eine Platte mit den oben beschriebenen Salzzusätzen ausgeimpft und bebrütet. Nach 3 Tagen werden die Platten geöffnet und das Wachstum auf salzfreien und salzhaltigen Platten verglichen.

Die Platten werden verrieben und weitere 5 Tage bebrütet.

Ergebnis: die vergleichende Betrachtung der Kolonien auf salzfreien und salzhaltigen Platten ergab keine wesentlichen Wachstumsunterschiede.

Die Cyclamatspaltung wurde durch den Salzzusatz nicht verbessert. Vielmehr zeigten die Kontrollplatten ohne Salzzusatz eine höhere Spaltung.

Tabelle 9:CHA-Bildung auf salzhaltigen und salzfreien Optimal NB

Suspension	CHA ($\mu\text{g/ml}$) OptimalNB ohne Salz	CHA ($\mu\text{g/ml}$) Opt.NB mit Salz
10 ⁻²	zerbrochen	32,61
10 ⁻³	54,48	12,00
10 ⁻⁴	14,40	5,45
10 ⁻⁵	3,84	0
10 ⁻⁶	0	0
10 ⁻⁷	0	0
10 ⁻⁸	0	0
10 ⁻⁹	0	0

3.227 Zusatz von Galle

Gallezusatz zu Nährmedien fördert bekanntermassen das Wachstum der gramnegativen anaeroben Stäbchen.

Im 12. Versuch versetzten wir deshalb unseren Optimalboden mit 10% Rindergalle.

Die erreichte Spaltung nach einer Bebrütung von 3+5, bzw. 5 Tagen betrug 0,2 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 0,36 $\mu\text{g/ml}$ CHA und war somit gering.

3.228 Zusatz von Harnstoff

Dem Optimal-NB wird 0,5% Harnstoff zugegeben, dann werden die Platten mit je 0,1 ml einer 10⁻² Stuhlsuspension beimpft, 3 Tage bebrütet, verrieben und weitere 5 Tage bebrütet. Bei der Verreibung wird gleichzeitig eine neue Platte (mit a bezeichnet) angelegt und ebenfalls 5 Tage bebrütet.

Eine mitgeführte Harnstoff - freie Platte wird ebenfalls 5 und 3+5 Tage bebrütet.

Tabelle 10: CHA-Bildung bei Harnstoffzusatz, zum Vergleich eine Harnstoff-freie Platte.

Platte Nr.	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 3+5 Tage Bebr.	CHA ($\mu\text{g/ml}$) 5 Tage Bebr.
78 78a	23,0	4,0
86 86a	15,74	9,48
81 81a (ohne Harnstoff!)	1,48	0,24

Das Ergebnis der Versuche 7 und 13 war somit relativ dürftig. Eine Anreicherung der gesuchten Keime durch ein Selektivmedium war nicht gelungen. Die gesuchte Keimart schien lediglich gegen Stapenor und Streptomycin nicht sehr empfindlich zu sein. Die Zusätze zu unserem Optimal-NB bewirkten - außer Harnstoff- keine Zunahme der Cyclamatspaltungsfähigkeit.

3.3 Abhängigkeit der CHA-Spaltung vom p_H -Wert.

Im folgenden erhob sich die Frage, ob die relativ gute Cyclamatspaltung bei Harnstoffzusatz zum OptimalNB ein direkter Effekt des Harnstoffes oder nur die Folge einer durch ihn ausgelösten p_H - Verschiebung war.

Deshalb bestimmten wir den p_H - Wert unseres Harnstoff-haltigen Bodens vor und nach Bebrütung, stellten dann mit KOH und NH_4OH unser Optimalmedium ohne Harnstoff auf verschiedene p_H -Werte ein und führten eine Vergleichsuntersuchung durch.

Versuch 14:

Optimal-NB-Platten mit und ohne Harnstoffzusatz und Optimal-NBplatten, die mit Hilfe von KOH und NH_4OH auf p_H 8;8,5; und 9 eingestellt sind, werden mit 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension von Fr. K. und H.M. beimpft, 3 Tage bebrütet, verrieben und weitere 5 Tage bebrütet.

Der pH-Wert des Harnstoff-haltigen Bodens (0,5 und 1%) betrug vor Bebrütung 6,3 nach Bebrütung 7,3.

Tabelle 11: CHA-Entstehung in Abhängigkeit vom pH-Wert

	CHA(μ g/ml) Bebr. 3+5 Tage
Fr.K. Optimal NB, pH 6,5	5,8
H. M. Optimal NB, pH 6,5	2,4
Fr.K. Opt.+0,5% Harnstoff, pH 7,2	6,24
H. M. Opt.+0,5% Harnstoff, pH 7,2	0,59
Fr.K. Opt.+ 1% Harnstoff, pH 7,3	6,58
H. M. Opt.+ 1% Harnstoff, pH 7,3	8,04
Fr.K. Optimal NB, pH 8,0	29,15
H. M. Optimal NB, pH 8,0	3,39
Fr.K. Optimal NB, pH 8,5	0,17
H. M. Optimal NB, pH 8,5	2,96
Fr.K. Optimal NB, pH 9,0	0
H. M. Optimal NB, pH 9,0	0

Dieser Versuch zeigte, daß für die Cyclamatspaltung ein pH-Bereich von 7,5 bis 8,0 am günstigsten ist, so daß vermutet werden kann, daß der positive Effekt des Harnstoffzusatzes wohl hauptsächlich durch die pH-Verschiebung zustande kommt.

3.4 Isolierung von Reinkulturen

3.41 Methode

Je 0,1 ml einer 10^{-2} bis 10^{-6} Stuhlsuspension von Fr.K. werden auf unseren Optimal-NB(Cystein-Hefeextrakt - Basismedium mit Hammelblut und 1% Cyclamatzusatz), dem 0,5 % Harnstoff beigegeben ist, ausgespatelt (pH7,5). Die gleichen Verdünnungen werden außerdem auf einen auf pH 8 eingestellten, Harnstofffreien Optimalboden ausgeimpft.

Die Versuche werden doppelt angelegt, d.h. 4 Platten pro Verdünnung.

Eine Serie wird als Mischkultur nach 3-tägiger Bebrütung mit einem Glasspatel verrieben und nach weiteren 5 Tagen Bebrütung auf CHA untersucht. Die entsprechende 2. Serie wird zur Isolierung von Reinkulturen verwandt, indem Einzelkolonien abgeimpft werden. Die Abimpfung der Einzelkolonien wird nach 3 Tagen Bebrütung durchgeführt, da dieser Termin wegen der Koloniegröße und der damit verbundenen besseren Unterschiedsmöglichkeit als optimal erscheint. Die Abimpfung erfolgt mit einer Platinnadel. Das Material wird in einen Tropfen sterile phys. Kochsalzlösung eingebracht und- um eine gleichmäßige Ausplattierung des Materials zu erhalten- mit einem Glasspatel auf unserem Optimal-NB verrieben. Mit der gleichen Platinnadel wird anschließend ein Kligler-Schrägagar beimpft, um so eine weitere Differenzierungsmöglichkeit zu gewinnen. Alle isolierten Stämme werden 5 Tage bebrütet und dann zur CHA-Bestimmung gegeben. Die Differenzierung erfolgt durch Präparat und Bunte Reihe.

Versuch 15.

In der oben beschriebenen Weise werden je 0,1 ml einer Stuhlsuspension (10^{-2} bis 10^{-6}) in doppelt angelegter Versuchsanordnung auf Harnstoffhaltige und- freie Optimal-NB-Platten ausgeimpft, 3 Tage bebrütet. Dann wird eine Serie zur Gewinnung von Reinkulturen verwendet, die andere wird verrieben und nach weiteren 5 Tagen Bebrütung zur CHA-Bestimmung gegeben.

Schema der Versuchsordnung: Serie I. II

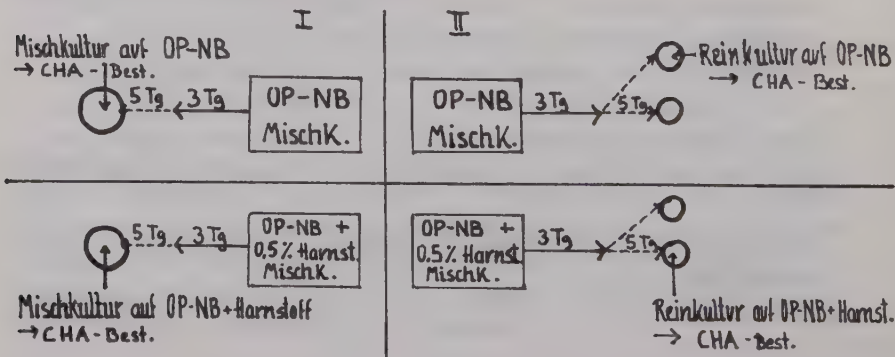


Tabelle 12: CHA-Bildung der Serie I, Versuch 15

Suspension	CHA (µg/ml)	CHA (µg/ml)
	Optimal NB, pH8	Optimal NB+0,5%Harnst.pH 7,5
10 ⁻²	0,8	4,24
10 ⁻³	14,76	5,08
10 ⁻⁴	0	9,06
10 ⁻⁵	0	0
10 ⁻⁶	0	0

Serie II: bei der Abimpfung der Einzelkolonien zeigt sich, daß auf den Platten, die mit einer 10⁻², bzw. 10⁻³ Stuhlsuspension beimpft waren, nach 3 Tagen mehr als 100 Kolonien gewachsen sind. Eine Isolierung von diesen Platten ist deshalb aus technischen Gründen nicht möglich. Es werden Einzelkolonien aus den mit 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ beimpften Platten auf Optimal-NB und Kligler Agar übertragen, 5 Tage bebrütet und zur CHA-Bestimmung gegeben. Außerdem erfolgt die Differenzierung dieser Reinkulturen an Hand von Präparat und Bunter Reihe.

Ergebnis: Keine der isolierten Reinkulturen spaltete Cyclamat. Bei der Differenzierung zeigten sich vorwiegend fakultative Anaerobier, z.B. E.coli, coliforme Bakterien usw. Nicht isoliert wurden Enterokokken.

Betrachtet man das Versuchsergebnis der Serie I, so wird deutlich, daß man bei Gewinnung von Einzelkolonien aus den Verdünnungen 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ kaum damit rechnen kann, CHA bildende Keime anzuzüchten. Denn in diesem Bereich weisen bereits die Mischkulturen keine konstante Cyclamatspaltung mehr auf.

So macht dieser Versuch deutlich, daß die Isolierung von zur Cyclamatspaltung-befähigten Bakterien ein schwieriges Unterfangen ist, da die Bakterien bei einer 10⁻⁵ Verdünnung schon nicht mehr vorkommen und andererseits die Isolierung aus wenig verdünnten Suspensionen technisch kaum möglich ist.

3.42 Erneute Isolierung von Reinkulturen mit abgeänderter Methode.

Versuch 16:

Mischkulturen (ausgehend von den Stuhlsuspensionen 10^{-2} von Fr. K. und Herrn M., die im 6. Versuch bereits eine Cyclamatspaltung gezeigt hatten) werden 16 Tage lang auf einem Harnstoff-haltigen Optimal-NB bebrütet, dann wird der Agar mit der Spritze zerquetscht und in je 20 ml phys. NaCl eingebracht. Diese Flüssigkeit wird weitere 24 Stunden bei 37°C bebrütet.

(Unter der Vorstellung, daß das Cyclamat im Nährboden bei Bebrütung in Flüssigkeit von den Bakterien besser angegriffen werden kann.)

Frühere Spaltung der verwendeten Mischkulturen:

Nr. 25:	140,6 $\mu\text{g/ml}$	CHA
Nr. 26:	71,58	"
Nr. 29:	13,26	"
Nr. 30:	150,88	"

Nach der Bebrütung der Flüssigkeiten werden diese fraktioniert auf Harnstoff-haltige Optimal-NB-Pl. ausgestrichen und aerob und anaerob bebrütet. Einzelkolonien werden nach 3-tägiger Bebrütung abgeimpft, in einem Tropfen phys. Kochsalzlösung auf Harnstoff-haltigem Optimalmedium verrieben und weitere 5 Tage aerob und anaerob bebrütet.

Die aerob bebrüteten Keime zeigten ausnahmslos keine Cyclamatspaltung.

Tabelle 13: CHA-Bildung bei Reinkulturen und zur KONTROLLE mitgeführten Mischkulturen, Bebr. 5 Tage anaerob.

Reink. von Nr. 25	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
Nr. 67	0
Nr. 68	0
Nr. 69	0
Mischk. von Nr. 25	
Nr. 70	0

<u>Reinkultur von Nr. 26</u>	<u>CHA μg/ml</u>
Nr. 71	0
Nr. 72	0
Nr. 73	0
Nr. 74	0
Nr. 75	0
<u>Mischk. von Nr. 26</u>	
Nr. 76	8,19
<u>Reinkultur von Nr. 29</u>	
Nr. 77	0
Nr. 78	0
Nr. 79	0
Nr. 80	0
<u>Mischk. von Nr. 29</u>	50,22
<u>Reinkultur von Nr. 30</u>	
Nr. 82	0
Nr. 83	0
Nr. 84	0
Nr. 85	0
<u>Mischk. von Nr. 30</u>	
Nr. 86	50,82

Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, spaltete keine der isolierten Reinkulturen. Ihre Differenzierung durch Präparat (Gramfärbung) und Bunte Reihe ergab vorwiegend gramnegative Stäbchen(E.coli) und grampos. Stäbchen (Sporenbildner).

Die zur Kontrolle mitgeführten Mischkulturen (bis auf Nr.70) wiesen dagegen eine Cyclamatspaltung auf. Im Präparat fiel auf, daß diese Mischkulturen grampos. Kokken in Diploform (Streptococcus faecalis) enthielten. Unsere Aufmerksamkeit richtete sich daher erstmals auf Enterokokken, zumal auch das Ergebnis des 7. Versuches (Zusatz verschiedener Antibiotika zum Optimal-NB) diese Vermutung zu unterstützen schien.

3.5 Übergang auf flüssiges Nährmedium

Da die Aufarbeitung des Agars im Extraktionsvorgang relativ viel Zeit in Anspruch nahm (flüssige Nährmedien brauchen nur 2 min. extrahiert und zentrifugiert zu werden), gingen wir auf flüssiges Nährmedium über, auch unter der Vorstellung, daß das gebildete CHA in einer flüssigen Kultur weniger flüchtig ist als bei der Bildung durch Bakterien an der Agaroberfläche.

Wir wählten als Nährmedium eine modifizierte Rosenow-Bouillon (Vrgl.2.21), die im wesentlichen die gleiche Zusammensetzung wie unser Harnstoff-haltiges Optimal-medium hat, allerdings ohne Hammelblutzusatz.

Der Indikator nach Andrade dient zur Beurteilung des O₂-Gehaltes der Bouillon; vor Verwendung wird die Bouillon 15 Min. in den Dampftopf eingebracht, um allen Sauerstoff zu entfernen.

3.51 Untersuchung der Flüchtigkeit von CHA im flüssigen Medium.

Versuch 17:

Unbeimpfter Rosenow-Bouillon werden je 100 µg/ml CHA beigefügt.

Anschließend werden die Röhrchen (8) 5 Tage verschlossen bebrütet und zur CHA-Bestimmung gegeben.

Ergebnis: die bestimmten CHA-Mengen schwankten zwischen 90 und 95 µg/ml.

3.52 Mischkulturen in Rosenow-Bouillon .

Versuch 18:

Je 0,5 ml einer Stuhlsuspension 10^{-2} von Fr.K. werden in Rosenow-Bouillon eingebracht, 5 Tage bebrütet und wegen der hohen Flüchtigkeit des CHA mit Vaseline, bzw. Paraffin verschlossen; ein Röhrchen bleibt ohne Verschuß.

Ergebnis: in keiner der Mischkulturen wurde CHA nachgewiesen.

Da es theoretisch möglich schien, daß die in geringer Anzahl vorhandenen Cyclamat-spaltenden Bakterien im flüssigen Medium von der restlichen Flora leichter überwuchert werden, beschlossen wir, zur Anzucht der Keime weiterhin unser festes Optimalmedium mit Harnstoffzusatz zu verwenden und nur die Reinkulturen in flüssigem Medium zu züchten und auf CHA-Gehalt zu untersuchen.

3.6 Erneute Isolierung von Reinkulturen

Versuch 19:

Je 0,1 ml einer 10^{-2} und 10^{-3} Stuhlsuspension von Frau K. werden auf Harnstoff-haltiges Optimalmedium ausgespatelt, 17 Tage anaerob bebrütet. Dann wird der gesamte Agar mit einer Spritze zerquetscht, in je 20 ml phys. NaCl, das 1% Cyclamat enthält, eingebracht und weitere 24 Std. bebrütet.

1 ml dieser "Brühe" wird entnommen und mit phys. NaCl, dem 1% Cyclamat zugesetzt ist, verdünnt, u.z. werden Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-9} hergestellt.

Die übrige "Brühe" wird auf CHA untersucht. Von den Verdünnungen werden je 0,1 ml auf Harnstoff-haltiges Optimalmedium ausgespatelt. Nach 3-tägiger anaerober Bebrütung werden Einzelkolonien abgeimpft und in Rosenow-B. gebracht.

Zur Differenzierung werden außerdem 1 Thioglycolat-Bouillon und ein Kligler-Schrägagar angelegt.
Die Rosenow-B. wird mit Vaseline verschlossen, 5 Tage bebrütet und dann auf CHA untersucht.

Versuchsanordnung:

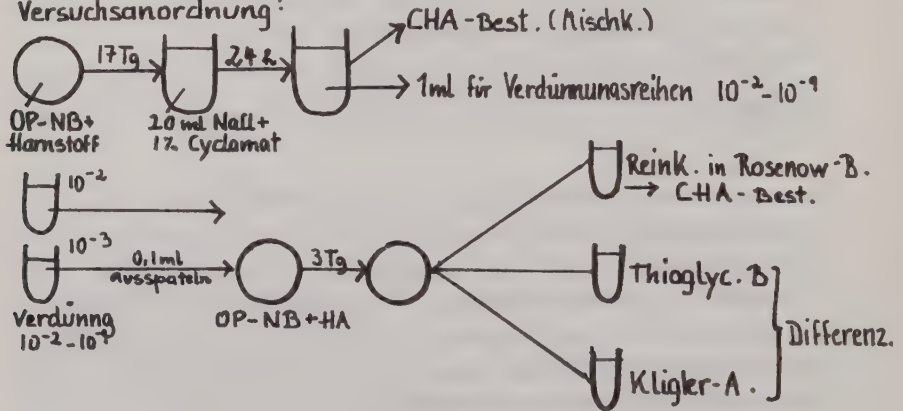


Tabelle 14: Cyclamatspaltung in Mischkulturen des 19. Versuches.

Suspension	CHA ($\mu\text{g/ml}$)
10^{-2} Nr. 42	0,2
10^{-2} Nr. 43	0,12
10^{-2} Nr. 44	0,06
10^{-3} Nr. 45	12,76
10^{-3} Nr. 46	6,8
10^{-3} Nr. 47	2,59

Von Nr.42 werden die Mischkulturen(=Verdünnungs-r.)Nr.1 - Nr. 7,
von Nr.43 werden die " kulturen " Nr.8 - Nr.14,
von Nr.44 werden die " kulturen " Nr.15 - Nr.17,
von Nr.45 werden die " kulturen " Nr.18 - Nr.24,
von Nr.46 werden die " kulturen " Nr.25 - Nr.31,
von Nr.47 werden die " kulturen " Nr.32 - Nr.34,
angelegt.

Die aus diesen Kulturen gewonnenen Reinkulturen tragen die Buchstaben des Alphabetes.

Tabelle 15: CHA-Bildung bei Reinkulturen des 19.Versuches

Nr. Morphologie	Präparat	CHA µg/ml
1a groß, ausgefranst	grampositive Kokken	0,40
32f kleine farblose	grampositive Kokken	0,62
32h Mischkultur	grpos.Kokken+grpos.ST	0,3
33a mittelgroß, gelblich	grampositive Kokken	0,69
33b groß, ausgefranst	dicke grampos.Kokken	0,45
33c groß, gewölbt	dicke grampos.Kokken	0,52
33g groß, gezackt	dicke grampos.Kokken	0,42
33t groß, glatt	grampositive Kokken	4,5

Insgesamt wurden im 19.Versuch 131 Einzelkolonien isoliert, davon waren 55 grampositive Kokken in Reinkultur.

Zur Cyclamatspaltung befähigt waren 8 der Reinkulturen von grampositiven Kokken.

3.61 Vermeidung der Vorinkubation mit Cyclamat

Nach einer Arbeit von Drasar, Renwick und Williams nimmt die Cyclamatspaltung bei Vorinkubation der Darmbakterien mit Cyclamat ab (1971).

Deshalb züchteten wir unsere Mischkulturen ab sofort auf Cyclamat-freiem Medium. Erst die Reinkulturen in Rosenow-B. kamen mit Cyclamat in Berührung.

Versuch 20:

Je 0,1 ml einer 10^{-2} Stuhlsuspension von Fr. K. werden auf Harnstoff-Cystein-Basismedium ohne Cyclamatzusatz ausgespatelt. Nach 3-tägiger Bebrütung werden wie im 19.Versuch mit dem zerquetschten Agar Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-9} hergestellt, auf Cyclamat-freien Agar ausgestrichen und weitere 3 Tage bebrütet. Dann werden von den Verdünnungen Einzelkolonien abgeimpft und in modifizierte Rosenow-B., die 1% Cyclamat enthält, eingebracht.

Gleichzeitig werden ein Kligler Schrägagar und eine Mischkultur zur Kontrolle auf Harnstoff-haltigem Optimalmedium (= mit 1% Cyclamat) angelegt.

Nach 5-tägiger Bebrütung erfolgt die CHA-Bestimmung.

Tabelle 16: CHA-Bildung bei Reinkulturen des 20. Versuches

Nr.	Morphologie	Präparat	CHA $\mu\text{g/ml}$
2	groß, schleimig	grampositive Kokken	0,14
4	groß, schleimig	grampositive Kokken	7,86
8	groß, glatt	grampositive Kokken	0,42
19	groß, schleimig	grampositive Kokken	0,52
23	mittelgroß, gewölbt	grampositive Kokken	0,58
29	groß, schleimig	grampositive Kokken	22,18
32	kleine Kolonie	grampositive Kokken	0,84
40	kleine Kolonie	grampositive Kokken	7,18
52	groß, gezackt	grampositive Kokken	0,78

Die zur Kontrolle mitgeführte Mischkultur (10^{-2} Suspension) bildete 42,20 $\mu\text{g/ml}$ CHA.

Insgesamt wurden im 20. Versuch 60 Einzelkolonien abgeimpft. 9 dieser Kolonien waren grampositive Kokken.

SIE WURDEN ALS STREPTOCOCCUS FAECALIS DIFFERENZIIERT UND ZEIGTEN AUSNAHMSLOS CYCLAMATSPALTUNG.

Allerdings entspricht die Verteilung 9 von 60 nicht den tatsächlichen Verhältnissen im Stuhl. Denn im Hinblick auf die Ergebnisse der früheren Versuche betrieben wir eine bevorzugte Isolierung von Enterokokken.

Nach einer Untersuchung von H. Werner, Reichertz und Schröter (1969) beträgt der Anteil der Enterokokken beim mischkosternährten Menschen 1-5% der menschlichen Darmflora. Daraus erklären sich auch die Schwierigkeiten bei der Isolierung des von uns gesuchten Cyclamat-spaltenden Keimes.

3.62 Nachuntersuchung des Konverters Frau K.

Nachdem die Isolierung des Cyclamat-spaltenden Keimes geglückt und dieser als Strept. Faecalis differenziert war, stellten wir uns die Aufgabe, den Spaltungsmechanismus näher zu untersuchen.

Aber ab November 1971 war eine Isolierung Cyclamat-spaltender Keime aus dem Stuhl unseres Konverters nicht mehr möglich.

Auch die Mischkulturen wiesen keine CHA-Bildung mehr auf. Nachdem wir unsere Versuchsbedingungen mehrfach überprüft hatten und keine Fehler finden konnten, entschlossen wir uns, unseren Konverter, Frau K., mit dessen Einwilligung, erneut mit Cyclamat zu belasten und Stuhl und Urin auf CHA zu untersuchen.

Versuch 21:

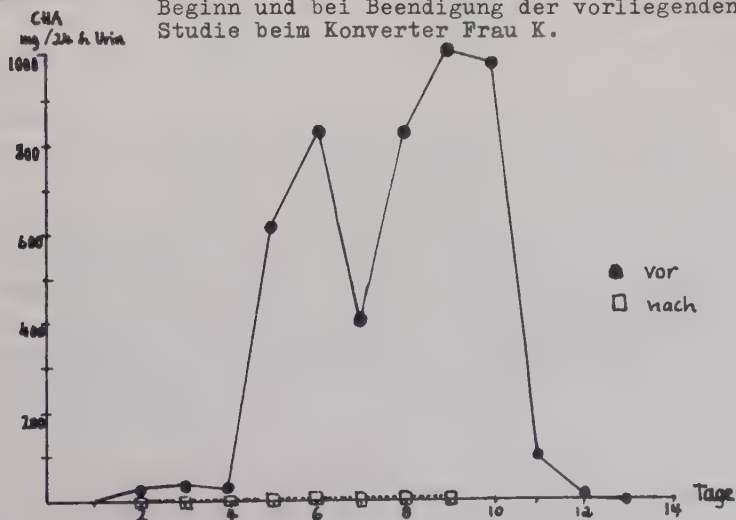
Über einen Zeitraum von 4 Tagen werden bei Fr. K. der 24-Stunden-Urin und 2 mal Stuhl gesammelt (Leerwert). Außerdem wird täglich der Blutdruck gemessen.

An 8 aufeinanderfolgenden Tagen erhält die Probandin dann 1 Tablette (1g) Cyclamat, an den Tagen 9 und 10 erhält sie 2 Tabletten. Während der gesamten "Behandlungszeit" und zwei Tage darüber hinaus werden Stuhl und 24-Stunden-Urin gesammelt und der Blutdruck überwacht.

Ergebnis: Der Blutdruck blieb während des Beobachtungszeitraumes unverändert, in keiner Stuhl- oder Urinprobe konnte CHA nachgewiesen werden.

Unser Konverter war demnach nicht mehr als Konverter zu betrachten und somit mußten wir unsere Untersuchung mit diesem unbefriedigendem Ergebnis beschließen und konnten keine weiteren Versuche über den Spaltungsmechanismus anschließen.

Tabelle 17: CHA-Bildung bei Belastung mit Cyclamat vor Beginn und bei Beendigung der vorliegenden Studie beim Konverter Frau K.



4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte- wie eingangs erwähnt-überprüft werden, ob Darmbakterien zur Cyclamat-spaltung befähigt sind.

Unsere Studie ergab, daß nur die Bakterienflora sogenannter Konverter Cyclamat zu CHA umwandeln kann. Nicht-konverter spalten Cyclamat nicht.

Die Cyclamatspaltung erfolgt nur, wenn die Keime unter anaeroben Bedingungen gezüchtet werden. Bei Anreicherung der Keime durch Neuverreibung und bei Bebrütung von mehr als 5 Tagen nimmt die Spaltungsfähigkeit zu. Sie wird ebenfalls positiv beeinflusst, wenn dem oben beschriebenen Optimal-NB Harnstoff zugegeben wird und der pH-Wert des NB so auf 7,5 bis 8 eingestellt wird.

Zusatz von Salzen, verschiedenen Zuckern und Antibiotika verbessert die Spaltungsfähigkeit nicht.

Die Isolierung von zur Cyclamatspaltung befähigten Keimen in Reinkultur war außerordentlich schwierig, die gesuchten Keime wurden als Enterokokken differenziert.

Untersuchungen zum biochemischen Mechanismus der Cyclamat-Spaltung konnten leider nicht durchgeführt werden, weil der Konverter im Verlauf der Studie die Fähigkeit zur Konversion verlor und eine CHA-Bildung nicht mehr nachweisbar war.

5. DISKUSSION

Während der letzten 5 Jahre wurde in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen, daß sowohl bei einzelnen Menschen wie auch bei verschiedenen Tierspecies oral verabfolgte Cyclamate zu CHA abgebaut und im Urin und Stuhl ausgeschieden werden (KOJIMA und ICHIBAGASE 1966, COLLINGS 1969, LEAHY, WAKEFIELD und TAYLOR 1967, SONDEERS, NETWAL und WIEGAND 1969, LITCHFIELD und SWAN 1971 etc.)

Neuere Untersuchungen befaßten sich mit der Frage, wo diese Umwandlung vonstatten geht.

RENWICK und WILLIAMS (1969, 1970) zeigten, daß bei Inkubation des Darminhaltes von Ratten mit Cyclamat CHA entsteht. Unter aeroben Bedingungen wurden bei ihnen 0,4 -2,5% der verabfolgten Cyclamatmenge, unter anaeroben Bedingungen 0,8-3,5%, zu CHA umgewandelt. GOLDBERG et al. (1969) erzielten bei anaerober Bebrütung von Dickdarminhalt von Hunden mit Cyclamat eine Umwandlungsrate von 0,25% und COLLINGS (1969, 1971) zeigte, daß auch der Darminhalt von Schweinen unter anaeroben Bedingungen zur Cyclamatspaltung befähigt ist und daß die CHA-Bildung nachläßt, wenn die Darmflora durch Applikation von Antibiotika (Neomycin) vorher reduziert wurde.

Vergleichbare Beobachtungen machten auch SONDEERS et al. (1970), als sie ihren menschlichen Probanden, gesicherten Konvertern, Neomycin verabreichten und danach einen Rückgang der CHA-Bildung feststellten. Außerdem zeigte dieses Forscherteam, daß bei vorher gesicherten Konvertern keine CHA-Bildung auftritt, wenn die Cyclamatgabe nicht oral, sondern intravenös erfolgt. Mit 14C-Cyclamat inkubierte Präparationen aus Leber, Milz, Niere und Blut von Ratten (Konverter und Nichtkonverter) zeigten keine nennenswerte CHA-Bildung, nämlich weniger als 0,05% bei beiden Versuchsgruppen.

Diese Untersuchungen machten nicht nur den Dickdarm als Ort der Cyclamatspaltung wahrscheinlich, sondern sprachen gleichzeitig dafür, daß der Abbauprozess bakteriell in Gang gesetzt wird, so daß daraufhin die Isolation der zur Cyclamatspaltung-befähigten Keime in den Vordergrund des Interesses rückte.

Uns gelang es, aus dem Stuhl eines Konverters Enterokokken zu züchten, die bei anaerober Bebrütung Cyclamat zu CHA abbauen konnten. Als Kriterien dafür, daß es sich bei den isolierten Keimen um Enterokokken handelte, betrachteten wir das Wachstum in Kettenform, Wachstum auf Claiberg II Böden, fehlende Hämolyse, Resistenz gegen Cloxacillin, Streptomycin, Polymycin und Na-Azid. Außerdem sprachen die vorhandene Aesculin- und Gelatinespaltung, sowie die auffällige Alkaliresistenz für das Vorliegen von Enterokokken.

Unser Ergebnis steht im Einklang mit DRASAR et al.(1971), die ebenfalls Enterokokken für die Cyclamatumwandlung beim Menschen verantwortlich machen. Cl.perfringens konnte bei unseren Experimenten Cyclamat nicht spalten, nach Angaben aus der Literatur soll jedoch auch diese Bakterienart bei Hund (GOLDBERG et al.1969) und Ratte (DRASAR et al.1971) zur CHA-Bildung fähig sein.

Unter den von uns gewählten Inkubationsbedingungen vermochten Reinkulturen in flüssigem Medium maximal 0,45% der Cyclamatmenge in CHA umzuwandeln, in der Mischkultur des gleichen Versuches wurde eine Umwandlungsrate von 0,85% erreicht.

Diese geringe Spaltungsquote erklärt sich nur teilweise aus der Tatsache, daß Enterokokken bloß 1-5% der gesamten Darmflora ausmachen, immerhin bedeutet das noch 10⁷ Enterokokken pro Gramm Stuhl. Von großer Bedeutung scheint auch die Inkubationsdauer zu sein, die aus technischen Gründen nicht optimal lange durchgeführt werden konnte. Unterstützt wird dieser letzte Gesichtspunkt zum Beispiel auch durch eine Beobachtung von DAVIS et al.1968, daß die CHA-Bildung bei Obstipation ansteigt.

Weiterhin dürften weitere, bisher unbekannte Kofaktoren, dafür verantwortlich sein, daß die Spaltung intra vitam die Spaltungsquote im Experiment so auffällig übertrifft.

Unsere Beobachtung, daß ein Konverter, Frau K., die Fähigkeit zur CHA-Bildung nach circa einjähriger Beobachtungszeit verlor, findet eine Parallele bei LITCHFIELD et al.(1970) und DAVIS et al.(1969), die bei einigen Probanden ebenfalls den Verlust der CHA-Bildung verzeichneten, im Gegensatz zu uns jedoch nicht auf die Anwesenheit von spaltungsbefähigten Enterokokken untersuchten.

Zusammenfassend sprechen unsere Beobachtungen dafür, daß die Fähigkeit der Enterokokken zur Cyclamatspaltung nicht permanent zu bestehen braucht oder daß die spaltungsfähigen Keime relativ rasch durch nicht-spaltende ersetzt werden können.

In toxikologischer Hinsicht erscheint folgende Schlußfolgerung erlaubt: wenn die Konverter-Fähigkeit verloren werden kann, dann besteht theoretisch auch die Möglichkeit, die Konverterfähigkeit zu erwerben. Somit kann ein fluktuierender Anteil der Population von der Toxizität betroffen sein.

6. Tabellenverzeichnis

- Tab.1 : CHA-Bildung bei Stuhlverdünnung 10^{-2} bis 10^{-9} (4 Tage anaerob)
Tab.2 : CHA-Bildung bei Stuhlverdünnung 10^{-2} bis 10^{-9} (11 " anaerob)
Tab.3 : Abhängigkeit der CHA-Entstehung von der Bebrütungsdauer
Tab.4 : Zeitl. Abhängigkeit der CHA-Entstehung von der Bebrütungs-
dauer, z.Vergl. bei 2 Konvertern und 1 Nichtkonverter
Tab.5 : CHA-Bildung nach Neuverreibung
Tab.6a+b: CHA-Bildung nach Neuverreibung
Tab.7 : CHA-Bildung bei Mischkulturen auf Stapenor und
Streptomycin-haltigen NB
Tab.8 : CHA-Bildung bei besonderen Zusätzen im Optimal-NB
Tab.9 : CHA-Bildung auf salzhaltigem und salzfreien Optimal-NB
Tab.10: CHA-Bildung bei Harnstoffzusatz
Tab.11: CHA-Entstehung in Abhängigkeit vom pH-Wert
Tab.12: CHA-Bildung der Serie I (Versuch 15)
Tab.13: CHA-Bildung bei Reinkulturen und zur Kontrolle mit-
geführten Mischkulturen.
Tab.14: CHA-Bildung in Mischkulturen des 19. Versuches
Tab.15: CHA-Bildung in Reinkulturen des 19. Versuches
Tab.16: CHA-Bildung in Reinkulturen des 20. Versuches
Tab.17: CHA-Bildung bei Belastung mit Cyclamat vor Beginn
und bei Beendigung der vorliegenden Studie beim
Konverter Frau K.

7. LITERATURVERZEICHNIS

BEERENS, H.: Les Bacteries Anaerobies

Manuel de Techniques Bacteriologiques von
R. Buttiaux, H. Beerens und Taquet
Flammarion Verlag, Paris 1962

BUNGARD C. : Die Süßstoffe, Teil V

Der Deutsche Apotheker, 23 (1971)

COLLINGS, A.J.: Metabolic Studies on Sodium Cyclamate
22.10.1969 München

DAVIS, T.R.A., ADLER, N., OPSAHL, J.: Excretion of CHA in
Subjects
Ingesting Sodium-Cyclamate
Toxicol. app. Pharmacol. 15, 106-116 (1969)

DENGLER, H.J.: Umwandlung von Cyclamaten in CHA und deren
Konsequenzen für den Menschen

Ernährungswiss. Kolloquium am 15.6.71 in Gießen

DRASAR, B.S. RENWICK, A.G. WILLIAMS, R.T.: The Conversion of
Cyclamate into CHA by Gut Bacteria

Proceedings of the Biochemical Society 26P (1971)

EICHELBAUM, M. HENGSTMANN, J., DENGLER, H.J.: Die Wirkung von
CHA auf die Noradrenalin Aufnahme und den Nor-
adrenalingehalt des Rattenherzens
Naunyn - Schmiedebergs
Arch. Pharmakol. 267, 353-363 (1970)

EICHELBAUM, M. HENGSTMANN, J.: Eine spezifische und empfindliche
Methode zur Bestimmung von CHA in biologischen
Flüssigkeiten
Arch. Toxicol. 27, 136 - 141 (1971)

GOLDBERG, L. PAREKH, C., PATTI, A., SOIKE K.: Cyclamate
Degradation in Mammals and in Vitro
Toxicol. appl. Pharmacol 14, 654 (1969)

HENGSTMANN, J. EICHELBAUM, M., DENGLER, H.J.: Pharmacokinetic
Properties and Cardiovascular Actions of CHA in
Human Beings
Suppl. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. B60 (1971)

KOCH, FR.E.: Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen
Zentralblatt für Bakteriologie 132, 358-365 (1934)

- KOJIMA, S., ICHIBAGASE, H.: Studies on Synthetic Sweetening Agents XIII
Chem. Pharm. Bull. 16 (9) 1851-1854(1968)
- KOJIMA, S., ICHIBAGASE, H.: Synthetic Sweetening Agents VIII
Chem. Bull. 14, 971-974 (1966)
- LEAHY, J.S., WAKEFIELD, M., TAYLOR, T.: Urinary Excretion of CHA following oral administration of Sodium Cyclamate to Man.
BIBRA Bull. 5, 669
- LITCHFIELD, M. H., SWAN, A.A.B.: Cyclohexylamine Production and Physiological Measurements in Subjects Ingesting Sodium Cyclamate
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 535-541 (1971)
- OSER, B.L. CARSON, S., VOGIN, E.E., SONDEERS, R.C.: Conversion of Cyclamate into CHA in Rats
Biochem. Journal 114, 78P
- RENWICK, A.G., WILLIAMS, R. T.: The Metabolism of Cyclamates
Preceedings First International Sugar Research Conference, Brussel, 10.-11.3.1970
- SONDEERS, R.C., WIEGAND, R.G.: Absorption and Excretion of Cyclamate in Animals and Man
Toxicol. appl. Pharmacol. 12, 291 (Abstract)
- SONDEERS, R.C., NETWAL, J. C. WIEGAND, R.G.: Site of Conversion of Cyclamates to CHA
1969 Aspet Fall Meeting in Pittsburgh
- SONDEERS, R.C. ESTEP, C. B., Wiegand, R.G.: Metabolism of CHA (Abstract)
Fred. Proc. 27, 238 (1968)
- TREVOR WILLIS A.: Anaerobic Bacteriology in Clinical Medicine
Butterworths, London, 1964
- WERNER, H., REICHERTZ, C., SCHRÖTER, G.: Der Bacteroides - Anteil der menschlichen Darmflora
Zentralblatt für Bakteriologie 212, S-53-537(1970)
- WERNER, H.: Die gramnegativen anaeroben Stäbchen des Menschen
Gustav Fischer Verlag, Jena 1968

WERNER, H. : Zum gegenwärtigen Stand der Diagnostik der
gramnegativen anaeroben sporenlosen Stäbchen
(Übersichtsreferat)

Zentralblatt für Bakteriologie 197, 137-158(1965)

ZBINDEN, G. : Toxikologie der Cyclamate. Ernährungssymposium
"ERNÄHRUNGSFORSCHUNG UND NAHRUNGSMITTELPRODUKTION-
Stand und zukünftige Möglichkeiten "

Zürich 10.4.1970

zit. nach Bungard 1971

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.Dengler,
der mir freundlicherweise das Thema überliess
und mir bei der Durchführung der Arbeit wertvolle
Ratschläge erteilte.

Herzlich danke ich auch Herrn Prof.Dr.Wellensieck
und Frau Dr.Gernand,die die Anzüchtung der ver-
wendeten Bakterien vornahmen und so das Zustande-
kommen der Arbeit erst ermöglichten.

Weiterhin danke ich Frl.Brigitte Allmeling für
die Anleitung beim Erlernen der Methode.

Lebenslauf

=====

Am 6.9.44 wurde ich als erstes Kind meiner Eltern, des Fleischermeisters Hubert Kühnl und seiner Ehefrau Franziska, geb. Kunerl, in Tschebon/CSSR geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Gambach/Krs. Friedberg, anschließend 9 Jahre die St. Lioba Schule in Bad-Nauheim, wo ich am 20.2.1964 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1964 begann ich mein Medizinstudium an der Justus Liebig-Universität in Gießen, bestand dort nach 2 Semestern die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, nach 5 Semestern die Ärztliche Vorprüfung und im Juli 1970 das Staatsexamen.

Im gleichen Monat heiratete ich meinen Mann David Hetherly.

Die Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an den Kliniken der Justus Liebig-Universität.

Im September 1971 erhielt ich meine Approbation und war dann als Assistentin in der Med. Poliklinik tätig, bis ich im Mai 1972 nach München verzog.

Augenblicklich bin ich Assistenzärztin im Amerikanischen Hospital in München.

